

GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab

1 plaque - 96 tests 72386

5 plaques - 480 tests 72388

TROUSSE POUR LA DÉTECTION DE L'ANTIGÈNE VIH P24 ET ANTICORPS ANTI-VIH1 ET ANTI-VIH2 DANS LE SÉRUM/PLASMA HUMAIN PAR TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE



Contrôle de qualité du fabriquant

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par notre société.

TABLE DES MATIÈRES

1. BUT DU DOSAGE

GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab est technique immuno-enzymatique basée sur la détection de l'antigène VIH p24 et des anticorps anti-VIH1 (groupes M et O) et anti-VIH2 dans le sérum ou le plasma humain. Cette trousse peut être utilisée à la fois pour un dépistage Ag VIH et anticorps anti-VIH.

2. INTÉRÊT CLINIQUE

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie infectieuse d'origine virale se traduisant par un déficit profond de l'immunité cellulaire.

Deux types de virus apparentés au groupe des lentivirus ont été isolés des lymphocytes de patients atteints de SIDA ou de ses prodromes. Le premier nommé VIH1 a été isolé en France, puis aux Etats-Unis. Le second nommé VIH2 a été isolé chez deux malades d'origine africaine et s'est révélé être responsable d'un nouveau foyer de SIDA en Afrique de l'Ouest.

Les connaissances sur la variabilité génétique des souches des virus VIH ont été acquises par le séquençage des gènes GAG, POL et ENV des souches représentatives de chacun des sous-types. Les virus VIH1 sont divisés en 2 groupes : le groupe M (comprenant 9 sous-types (A à I) et le groupe O. Le virus VIH2 comprend 5 sous-types. La répartition géographique des différents sous-types est maintenant assez bien définie. Certains variants VIH1 n'ont que 70% d'homologie pour les gènes GAG et POL avec les principaux isolats et seulement 50% pour le gène ENV; ces différences peuvent expliquer l'échec du diagnostic de l'infection chez certains patients.

Les différentes souches du virus VIH2 présentent des communautés antigéniques avec le virus simien SIV au niveau de toutes les protéines (protéines d'enveloppe et protéines internes : hétérologie : 30%), mais présentent moins de 40% d'homologie avec les protéines d'enveloppe du virus VIH1.

Les antigènes VIH et les anticorps apparaissent et sont détectables à différents stades des séroconversions et de l'infection. Le test GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab permet la détection simultanée des anticorps anti-VIH1 (groupes M et O) et anti-VIH2, ainsi que des antigènes VIH (voir également limites de la méthode).

3. PRINCIPE DE LA TROUSSE GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab

GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab est une trousse immuno-enzymatique basée sur le principe sandwich pour la détection de l'antigène VIH et des différents anticorps associés aux virus VIH1 et/ou VIH2, dans le sérum ou plasma humain.

La phase solide est préparée avec :

- des anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène p24 du VIH1.
- des antigènes purifiés : une protéine gp 160 recombinée, un peptide synthétique mimant un épitope spécifique du virus VIH 1 groupe O totalement artificiel (c'est à dire codé par aucun virus existant) ainsi qu'un peptide mimant l'épitope immunodominant de la glycoprotéine d'enveloppe du virus VIH2.

Les conjugués sont préparés avec :

- des anticorps polyclonaux biotinylés contre l'Ag VIH (conjugué 1).
- de la streptavidine et des antigènes VIH marqués à la peroxydase (peptides gp 41 et gp 36 mimant les épitopes immunodominants des glycoprotéines d'enveloppe des virus VIH1 et VIH2 et le même peptide synthétique mimant un épitope spécifique du virus VIH 1 groupe O totalement artificiel que celui utilisé dans la phase solide) (conjugué 2).

La mise en œuvre du test comprend les étapes réactionnelles suivantes :

1. Le conjugué 1 (anticorps polyclonal anti-p24 du VIH1 biotinylé) est distribué dans toutes les cupules de la microplaque
2. Les sérums à étudier, ainsi que les contrôles sont distribués dans les cupules :
   - Les antigènes VIH éventuellement présents se fixent sur les anticorps monoclonaux de la phase solide et forment des complexes avec les anticorps biotinylés du conjugué 1
   - Si des anticorps anti-VIH1 et/ou VIH2 sont présents, ils se lient aux antigènes fixés sur la phase solide.
   - Le dépôt du conjugué 1 et des échantillons est validé par un changement de couleur, du jaune-vert au bleu.

3. Après incubation à 37°C, puis lavage, le conjugué 2 est distribué :
   - La streptavidine réagit avec les complexes Ac-Ag-Ac biotinylés éventuellement fixés sur la phase solide
   - Les antigènes VIH1 et VIH2 purifiés, marqués à la peroxydase se lient à leur tour aux IgG et/ou IgM et/ou IgA, retenus par la phase solide.
4. Après incubation à température ambiante (18-30°C) la fraction de conjugué 2 restée libre est éliminée par lavage. Après une nouvelle incubation à température ambiante (18-30°C) la présence de l'enzyme immobilisée sur les complexes est révélée par la modification de la coloration du substrat.
5. Après arrêt de la réaction, la lecture s'effectue au spectrophotomètre à 450/620-700 nm.

L'absorbance observée pour un échantillon permet de conclure quant à la présence ou l'absence d'antigène VIH et/ou d'anticorps anti-VIH1 et/ou VIH2.

4. COMPOSITION DE LA TROUSSE

Tous les réactifs sont destinés à l'usage exclusif du diagnostic "*in-vitro*".

ETIQUETAGE	NATURE DES RÉACTIFS	PRÉSENTATION	
		72386	72388
R1	**Microplaque** 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des anticorps monoclonaux (souris) anti-p24 du VIH1 et des antigènes VIH1 et VIH2 purifiés	1 plaque	5 plaques
R2	**Solution de lavage concentrée 10 fois** Tampon Tris NaCl pH 7,4 Conservateur : Merthiolate de Sodium 0,01%	1 flacon (100 ml)	2 flacons (2 x 250 ml)
R3	**Contrôle négatif** Plasma humain inactivé par chauffage, négatif en antigène HBs et VIH et en anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et anti-VHC Conservateur : Azide de Sodium < 0,1%	1 flacon (2,5 ml)	1 flacon (2,5 ml)
R4	**Contrôle positif anticorps VIH** Diluant synthétique contenant du plasma humain inactivé par chauffage, positif en anticorps anti-VIH, négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VHC. Conservateur : ProClin™ 300 < 0,1%	1 flacon (1 ml)	1 flacon (1 ml)
R5	**Contrôle positif Ag VIH** Diluant synthétique contenant de l'antigène VIH1 purifié inactivé par la chaleur en présence d'un agent dissociant. Conservateur : ProClin™ 300 < 0,1%	1 flacon (1 ml)	1 flacon (1 ml)
R6	**Conjugué 1** Anticorps polyclonaux (mouton) biotinylés anti-p24 VIH1 coloré en jaune-vert Conservateur : ProClin™ 300 0,5%	1 flacon (10 ml)	2 flacons (2 x 10 ml)
R7a	**Conjugué 2** Streptavidine et antigènes VIH1 et VIH2 purifiés marqués à la peroxydase, lyophilisé	1 flacon (qsp 12,5 ml)	2 flacons (qsp 2x30 ml)
R7b	**Diluant du conjugué 2** Solution de lait écrémé coloré en rouge Conservateur: ProClin™ 300 0,5%	1 flacon (12,5 ml)	2 flacons (2 x 30 ml)
R8	**Tampon substrat** Solution d'acide citrique et d'acétate de Sodium pH 4,0, contenant 0,015% d'H2O2 et 4% de DMSO	1 flacon (60 ml)	2 flacons (2 x 60 ml)
R9	**Chromogène** Solution contenant de la tetramethyl-benzidine (TMB)	1 flacon (5 ml)	2 flacons (2 x 5 ml)
R10	**Solution d'arrêt** Solution d'acide sulfurique	1 flacon (28 ml)	3 flacons (3 x 28 ml)
	Feuilles adhésives pour microplaques	4	12

5. PRÉCAUTIONS

La qualité des résultats est dépendante du respect des bonnes pratiques de laboratoire suivantes :

- Ne pas utiliser de réactifs après la date d'expiration.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents au cours d'un même essai.

REMARQUE : Il est possible d'utiliser d'autres lots de solution de lavage (R2, identifié 10 x en bleu sur l'étiquette), de tampon substrat (R8, identifié TMB buf. en bleu), de chromogène (R9, identifié TMB 11x. en violet) et de solution d'arrêt (R10, identifié 1N en rouge), que ceux fournis dans la trousse sous réserve d'utiliser un seul et même lot de ceux-ci au cours d'un même essai. Ces réactifs peuvent être utilisés avec d'autres produits de notre société, contacter nos services techniques pour obtenir des informations détaillées.

- Avant utilisation, il est nécessaire d'attendre 30 minutes pour que les réactifs s'équilibrent à la température du laboratoire.
- Reconstituer soigneusement les réactifs en évitant toute contamination.
- Ne pas réaliser le test en présence de vapeurs réactives (acides, alcalines, aldéhydes) ou de poussières qui pourraient altérer l'activité enzymatique des conjugués.
- Utiliser une verrerie parfaitement lavée et rincée à l'eau distillée ou de préférence du matériel à usage unique.
- Ne pas laisser la microplaque sécher entre la fin du lavage et le début de la distribution des réactifs.
- Le temps d'attente entre la distribution du conjugué 1 et des échantillons ne doit pas excéder 10 minutes.
- La réaction enzymatique est très sensible à tous métaux ou ions métalliques. En conséquence, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec les différentes solutions contenant les conjugués ou le substrat
- La solution de révélation (tampon substrat + chromogène) doit être colorée en rose. L'apparition d'une autre coloration dans les minutes suivant la reconstitution indique que le réactif est inutilisable et doit être remplacé.

  Pour cette préparation, utiliser de préférence des récipients et du matériel de distribution en plastique à usage unique ou de la verrerie préalablement lavée à l'acide chlorhydrique 1N, rincée à l'eau distillée et séchée. Conserver cette solution à l'abri de la lumière.
- Utiliser un cône de distribution neuf pour chaque échantillon.
- Le lavage des cupules est une étape essentielle de la manipulation: respecter le nombre de cycles de lavage prescrits, et s'assurer que toutes les cupules sont remplies, puis complètement vidées. Un mauvais lavage peut entraîner des résultats incorrects.
- Ne jamais utiliser le même récipient pour distribuer les conjugués et la solution de révélation.
- Vérifier l'exactitude et la précision des pipettes et le bon fonctionnement des appareils utilisés.
- Ne pas modifier le mode opératoire.

6. CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

Tous les réactifs de la trousse sont destinés à l'usage du diagnostic "*in vitro*".

- Porter des gants à usage unique lors de la manipulation des réactifs.
- Ne pas "pipeter à la bouche".
- Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation du contrôle négatif (R3), a été testé et trouvé négatif en antigène HBs et VIH et en anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et anti-VHC.
- Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation du contrôle positif anticorps VIH1 (R4) a été testé et trouvé négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VHC.
- Le matériel utilisé dans la préparation du contrôle Ag VIH positif (R5) a été inactivé en présence d'un agent dissociant.
- Du fait qu'aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'absence de virus VIH, Hépatites B ou C ou d'autres agents infectieux. Considérer ces réactifs, ainsi que les échantillons de patients, comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage.
- Considérer le matériel directement en contact avec les échantillons et les réactifs, ainsi que les solutions de lavage, comme des produits contaminés et les traiter comme tels.
- Eviter les éclaboussures d'échantillons ou de solution les contenant.

- Les surfaces souillées seront nettoyées par de l'eau de javel diluée à 10%. Si le liquide contaminant est un acide, les surfaces souillées seront neutralisées au préalable avec du bicarbonate de soude, puis nettoyées à l'aide d'eau de javel et séchées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage devra être jeté dans un conteneur spécial pour déchets contaminés.
- Les échantillons, les réactifs d'origine humaine ainsi que le matériel et les produits contaminés seront éliminés après décontamination :
  - soit par trempage dans de l'eau de javel à la concentration finale de 5% d'hypochlorite de sodium (1 volume d'eau de javel pour 10 volumes de liquide contaminé ou d'eau) pendant 30 minutes
  - soit par autoclavage à 121°C pendant 2 heures minimum.

L'autoclavage à 121°C, pendant une heure minimum, est le meilleur procédé d'inactivation des virus VIH et du virus de l'hépatite B.

- ATTENTION : NE PAS INTRODUIRE DANS L'AUTOCLAVE DE SOLUTIONS CONTENANT DE L'HYPOCHLORITE DE SODIUM.

- Ne pas omettre de neutraliser et / ou d'autoclaver les solutions effluents ou tout liquide contenant des échantillons biologiques avant de les jeter dans l'évier.
- Certains réactifs contiennent 0,5% de ProClin™ 300


Xi - Irritant

ProClin™ 300 0,5% : Irritant

R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

S28-37 : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et du savon. Porter des gants appropriés

- La fiche de données de sécurité est disponible sur demande.
- D'autre part, la manipulation et l'élimination des produits chimiques doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- Eviter tout contact du tampon substrat, du chromogène et de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses (risques de toxicité, d'irritation et de brûlures).
- Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. L'azoture de sodium peut former des azotures de plomb ou de cuivre dans les canalisations du laboratoire. Ces azotures sont explosifs. Pour éviter toute accumulation d'azotures, rincer à grande eau les canalisations si les solutions contenant de l'azoture sont éliminées par l'évier après leur inactivation.

7. MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Eau distillée.
- Hypochlorite de sodium (eau de javel) et bicarbonate de sodium.
- Pipettes, multipipettes automatiques ou semi-automatiques, réglables ou fixes, pour mesurer et délivrer 25 µl, 75 µl, 80 µl et 100 µl.
- Eprouvettes graduées 25 ml; 100 ml; 1000 ml.
- Conteneur de déchets contaminés.
- Bain-marie ou incubateur de microplaques thermostaté à 37°C ± 1°C *(*).*
- Dispositif de lavage manuel, semi-automatique ou appareil de lavage pour plaque de microtitration *(*).*
- Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres 450 nm, 490 nm et 620-700 nm *(*).*
- Papier absorbant.

(*) Nous consulter pour une information précise concernant les appareils validés par nos services techniques.

8. RECONSTITUTION DES RÉACTIFS

NOTE : Avant utilisation, laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante (18 à 30°C).

1) Réactifs prêts à l'emploi

Réactif 1 (R1) : Microplaque

Chaque support cadre contenant 12 barrettes est conditionné en sachet ”ZIP“. Couper le sachet à l'aide de ciseaux ou scalpel 0,5 à 1 cm au-dessus du ZIP. Ouvrir le sachet et sortir le cadre. Replacer dans le sachet les barrettes inutilisées. Refermer le sachet soigneusement et le replacer à +2-8°C.

Réactif 3 (R3) : Contrôle négatif

Réactif 4 (R4) : Contrôle positif anticorps VIH

Réactif 5 (R5) : Contrôle positif Ag VIH

Réactif 6 (R6) : Conjugué 1

Réactif 10 (R10) : Solution d'arrêt

2) Réactifs à reconstituer

Réactif 2 (R2) : Solution de lavage concentrée 10 fois

Diluer 10 fois la solution dans l'eau distillée. On obtient ainsi la solution de lavage prête à l'emploi. Prévoir 800 ml pour une plaque de 12 barrettes.

Solution de travail du conjugué 2 : Réactif 7a (R7a) + Réactif 7b (R7b)

Taper doucement le flacon sur la paillasse pour détacher toute substance pouvant adhérer au bouchon de caoutchouc. Enlever le bouchon avec soin et verser le contenu d'un flacon de diluant conjugué dans le flacon de conjugué lyophilisé. Reboucher et laisser reposer pendant 10 minutes en remuant et en retournant de temps en temps pour faciliter la dissolution.

Solution de révélation enzymatique : Réactif 8 (R8) + Réactif 9 (R9)

Diluer 11 fois la solution de chromogène (R9) dans le tampon substrat (R8) (ex : 1 ml de réactif R9 +10 ml de réactif R8). Stabilité 6 heures à l'obscurité après reconstitution

9. VALIDITÉ - CONSERVATION

La trousse doit être gardée à +2-8°C. Chaque élément de la trousse GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab conservé à +2-8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret (sauf indication spécifique)

R1 : Après ouverture du sachet sous vide, les barrettes conservées à +2-8°C dans leur sachet d'origine, refermé avec soin, sont stables pendant 1 mois.

R2 : Après dilution, la solution de lavage se conserve 2 semaines à +2-8°C. La solution de lavage concentrée (R2) peut être conservée à +2-25°C.

R7a + b : Après reconstitution, les réactifs conservés à +2-8°C sont stables pendant 1 mois. Le conjugué reconstitué (R7 a+ b) et congelé est stable jusqu'à la date d'expiration du kit, il peut subir jusuqu'à 11 cycles de congélation / décongélation.

R8 + R9 : Après reconstitution, les réactifs conservés à l'obscurité sont stables pendant 6 heures à la température ambiante (18-30°C).

10. ÉCHANTILLONS

Prélever un échantillon de sang selon les pratiques en usage.

Les tests sont effectués sur des échantillons non dilués de sérum ou de plasma (collectés avec des anticoagulants comme l'EDTA, l'héparine, le citrate, l'ACD). Extraire le sérum ou le plasma du caillot ou des globules rouges dès que possible pour éviter toute hémolyse. Une hémolyse très prononcée peut affecter les performances du test. Les échantillons présentant des agrégats doivent être clarifiés par centrifugation avant le test. Les particules ou agrégats de fibrine en suspension peuvent donner des résultats faussement positifs.

NE PAS CHAUFFER LES ÉCHANTILLONS. Les échantillons seront conservés à + 2-8°C si le dépistage est effectué dans les 7 jours ou peuvent être conservés congelés à -20°C pendant plusieurs mois. Les plasmas devront subir une décongélation rapide par chauffage pendant quelques minutes à 40°C (pour limiter la précipitation de la fibrine). En raison de l'instabilité de l'Ag VIH à la chaleur, des températures supérieures ne pourront pas être utilisées. Eviter les congélations/ décongélations répétées. Les échantillons ayant été congelés et décongelés plus de 3 fois ne doivent pas être utilisés.

Si les échantillons doivent voyager, les emballer selon la réglementation en usage pour le transport des agents étiologiques.

NE PAS UTILISER DE SÉRUMS OU PLASMAS CONTAMINÉS, HYPERLIPÉMIQUES OU HYPERHÉMOLYSES.

REMARQUE : Aucune interférence n'a été mise en évidence sur des échantillons contenant jusqu'à 90 g/l d'albumine, 200 mg/l de bilirubine, et 50 µg/l de biotine ainsi que sur des échantillons lipémiques contenant jusqu'à 36 g/l de triglycérides et sur des échantillons hémolysés contenant jusqu'à 10 g/l d'hémoglobine.

11. MODE OPÉRATOIRE

Suivre strictement le protocole proposé.

Utiliser les sérums de contrôle négatif (R3), contrôle positif Ac VIH (R4) et contrôle Ag VIH positif (R5) à chaque mise en œuvre du test pour valider la qualité du test.

Appliquer les bonnes pratiques de laboratoire :

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons
2. Préparer la solution de lavage diluée (se référer au chapitre 8)
3. Préparer la solution de travail du conjugué 2 (se référer au chapitre 8)
4. Sortir le cadre support et les barrettes (R1) de l'emballage protecteur
5. Déposer directement, sans prélavage de la plaque, successivement (plan de plaque conseillé):
   - 5.1 25 µl de conjugué 1 (R6) dans chaque cupule
   - 5.2 75 µl de contrôle positif Ag VIH (R5) en A1
     75 µl de contrôle positif anticorps VIH (R4) en B1
     75 µl de contrôle négatif (R3) en C1, D1 et E1
     75 µl du premier échantillon en F1,
     75 µl du deuxième échantillon en G1, etc..

   en homogénéisant le mélange par 3 aspirations minimum avec la pipette de 75 µl ou en agitant la microplaque après l'étape de pipetage.

   N.B.: La distribution du conjugué 1 et des échantillons peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation : après addition des échantillons, le conjugué 1 qui est coloré en jaune-vert devient bleu. (Se référer au chapitre 14 pour la vérification automatique VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DES CONJUGUÉS)
6. Lorsque cela est possible couvrir d'un film autocollant en appuyant bien sur toute la surface pour assurer l'étanchéité.
7. Incuber la microplaque au bain-marie thermostaté ou dans un incubateur sec de microplaques pendant 1 heure ± 4 minutes à 37°± 1°C.
8. Retirer le film adhésif. Aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium) et ajouter immédiatement dans chacune d'elles un minimum de 0,370 ml de solution de lavage. Respecter un temps de trempage (temps d'attente) minimum de 30 secondes. Aspirer de nouveau. Répéter le lavage au moins 2 fois (soit un minimum de 3 lavages au total). Le volume résiduel doit être inférieur à 10 µl (si nécessaire sécher la plaque par retournement sur une feuille de papier absorbant). Si l'on dispose d'un laveur automatique, respecter le même cycle opératoire (voir chapitre 12 : ADAPTATIONS).
9. Distribuer rapidement 100 µl de la solution de travail du conjugué 2 (R7a + R7b) dans toutes les cupules. Le conjugué doit être agité avant emploi.

   N.B.: La distribution du conjugué 2 qui est de coloration rouge peut être visuellement contrôlée à ce stade de la manipulation. (Se référer au chapitre 14 pour la vérification automatique : VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DES RÉACTIFS)
10. Lorsque cela est possible, recouvrir d'un film neuf et incuber 30 ± 4 minutes à température ambiante (18-30°C).
11. Retirer le film adhésif, vider toutes les cupules par aspiration et laver au moins 5 fois comme précédemment. Le volume résiduel doit être inférieur à 10 µl (si nécessaire, sécher les barrettes par retournement sur une feuille de papier absorbant).
12. Distribuer rapidement dans toutes les cupules 80 µl de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée. Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 ± 4 minutes à température ambiante (18 à 30°C). Lors de cette incubation, ne pas utiliser de film adhésif.

    N.B.: La distribution de la solution de révélation, qui est colorée en rose, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation : Il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée. (se reporter au paragraphe 14 pour la vérification automatique : VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DES RÉACTIFS)

13. Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation.

    N.B.: La distribution de la solution d'arrêt, qui est incolore, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation. La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleu (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt.

14. Essuyer soigneusement le dessous des plaques. **Au moins 2 minutes après la distribution de la solution d'arrêt et dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction,** lire la densité optique à 450/620-700 nm à l'aide d'un lecteur de plaques.

15. S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

12. ADAPTATIONS

LAVAGE : Il est indispensable de respecter scrupuleusement les procédures de lavage afin d'obtenir les performances maximales du tests.

13. CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La présence ou l'absence d'antigène VIH ou d'anticorps anti-VIH1 et/ou anti-VIH2 détectable est déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil calculée.

1) Calculer la moyenne des absorbances du contrôle négatif (DO R3)

$$\overline{\text{DO R3}} = \frac{\text{DO (C1) + DO (D1) + DO (E1)}}{3}$$

2) Calcul de la valeur seuil

La valeur seuil sera déterminée par la formule suivante :

$$\text{VS} = \overline{\text{DO R3}} + 0.200$$

3) Validation de l'essai

L'absorbance de chaque contrôle négatif (R3) doit être inférieure à 0,170 : DO (R3) < 0,170
Il est possible d'éliminer au plus une valeur individuelle aberrante du contrôle négatif si sa densité optique se situe en dehors de la norme précédente. Dans ce cas, lorsque la valeur aberrante a été éliminée, refaire le calcul de la moyenne du contrôle négatif avec les deux valeurs restantes.
La moyenne des absorbances des contrôles négatifs doit être inférieure à 0,150 : $\overline{\text{DO R3}} < 0{,}150$
L'absorbance du contrôle positif anticorps VIH (R4) doit être supérieure à 0,9 : DO (R4) > 0,9
L'absorbance du contrôle positif Ag VIH (R5) doit être supérieure à 0,9 : DO (R5) > 0,9

4) Interprétation des résultats

Les échantillons dont les absorbances sont inférieures à la valeur seuil sont considérés négatifs d'après le test GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab.

Toutefois, les résultats situés juste au dessous de la valeur seuil (VS - 10 % < DO <VS) doivent être interprétés avec prudence et il est conseillé de tester de nouveau les échantillons correspondants en double lorsque les systèmes utilisés et les procédures du laboratoire le permettent).

Les échantillons dont les absorbances sont égales ou supérieures à la valeur seuil sont considérés initialement positifs d'après le test GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab. Ils doivent être contrôlés de nouveau en double avant l'interprétation finale.
Si après répétition de l'essai, pour un échantillon, l'absorbance des 2 doublets est inférieure à la valeur seuil, le résultat initial est non reproductible et l'échantillon est déclaré négatif selon le test GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab.
L'origine des réactions non reproductibles est souvent en relation avec les causes suivantes :

- lavage insuffisant des microplaques,
- contamination des échantillons négatifs par un sérum ou un plasma contenant un titre élevé d'anticorps,
- contamination ponctuelle de la solution de révélation par des agents chimiques oxydants (eau de javel, ions métalliques, etc....).
- Contamination de la solution d'arrêt.

Si après répétition de l'essai, l'absorbance mesurée sur l'un des deux doublets est égale ou supérieure à la valeur seuil, le résultat initial est reproductible et l'échantillon est déclaré positif avec le test GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab, conformément aux limites décrites ci-après.

14. VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DES RÉACTIFS

Vérification du dépôt du conjugué 1 et des échantillons

Après distribution du conjugué 1 (R6) et des échantillons, il est possible de vérifier la présence simultanée du conjugué 1 et des échantillons par une lecture spectrophotométrique à 620 nm : la densité optique d'une cupule contenant à la fois du conjugué 1 et de l'échantillon doit être supérieure à 0.600 (une DO plus faible indique une mauvaise distribution du conjugué ou de l'échantillon).

Vérification du dépôt de la solution de travail du conjugué 2

Après distribution de la solution de travail du conjugué 2 (R7a + R7b), il est possible de vérifier sa présence par une lecture spectrophotométrique à 450 / 620 nm : la densité optique d'une cupule contenant du conjugué 2 reconstitué doit être supérieure à 0.100 (une DO plus faible indique une mauvaise distribution du conjugué 2 reconstitué).

Vérification du dépôt de la solution de révélation

Il est possible de vérifier la présence de la solution de révélation rosée par lecture automatique à 490nm : une cupule contenant la solution de révélation doit avoir une densité optique supérieure à 0.100 (une DO plus faible indique une mauvaise distribution de la solution de révélation).

15. PERFORMANCES

Les performances du GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab ont été déterminées en testant des échantillons de donneur de sang non sélectionnés ainsi que des échantillons de patients infectés par le virus VIH ou des panels commerciaux de séroconversions. La limite de sensibilité pour la détection des Ag VIH a été établie par analyse de l'étalon Ag VIH de l'AFSSAPS.
Des échantillons de patients atteints d'affections sans relation avec le VIH ont également été testés.

Spécificité

La spécificité a été évaluée en testant :

1. 6038 échantillons de donneurs de sang non sélectionnés dans 3 sites différents. La spécificité sur donneurs de sang non sélectionnées était de 99.95% (6035 échantillons négatif / 6038 échantillons testés) avec 3 échantillons trouvés réactifs répétés et non confirmés en Western blot VIH tout comme en Ag VIH.
2. 409 échantillons non sélectionnés dans 2 laboratoires hospitaliers d'analyse, 14 échantillons ont été trouvés initialement réactifs dont 12 étaient répétés réactifs : 11 d'entre eux ont été confirmés par Western-Blot, 1 ne l'a pas été et a été considéré comme faussement positif. La spécificité sur cette population était de 99.75% (397 échantillons négatifs / 398 échantillons testés).
3. 313 patients montrant différentes pathologies ou statuts non liés au VIH (femme enceintes, facteur rhumatoïde, maladies auto-immune (SLE), cirrhose, insuffisance rénale chronique, dialyse, immunoglobulines anti-souris ou d'autres infections virales ou bactériennes (Hépatites A, B et C, Rubéole, Toxoplasmose, Oreillons, Rougeole, CMV, HSV, EBV, VZV, HTLVI, Malaria, patients vaccinés contre la grippe). La spécificité était de 98.72% sur cette population (309 échantillons négatifs / 313 échantillons testés) avec 4 réactions non spécifiques mais non significatives

Sensibilité

La sensibilité a été évaluée en testant des échantillons dont la présence d'anticorps anti VIH a été confirmée, des échantillons provenant de patients atteints d'infections aiguës ou provenant de panels commerciaux de séroconversions. Des échantillons contenant des antigènes VIH ont également été testés (purs ou dilués).

1) Echantillons dont la présence d'anticorps a été confirmée

745 échantillons positifs provenant du suivi de patients infectés par les VIH1 ou VIH2 on été analysés. la sensibilité obtenue dans cette étude était de 100%.

	Types	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons réactifs	Sensitivité
VIH 1	A, B, C (classification CDC)	200	200	100%
	WB VIH1 complet ou profil avec des bandes anti-gag faibles	200	200	100%
	groupe M (18A, 71B, 23C, 9D, 12 E, 4 F)	118	118	100%
	Groupe O	23	23	100%
	Groupe N	1	1	100%
	Panel BBI PRZ 204	7	7	100%
VIH 2	Profil WB VIH 2 complet	196	196	100%

2) Echantillons de patients atteints d'infection aiguë ou provenant de panels commerciaux de séroconversion

- 81 échantillons provenant de patients atteints d'infections VIH aiguë ou récemment infectés ont tous été trouvés positifs avec le GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab (35 échantillons provenant de 28 patients avec des profils de séroconversions en Western-Blot et 46 échantillons de patients récemment infectés)
- 20 échantillons de per-séroconversion ont été testés (échantillons de séroconversion précoce avec des profils Western-Blot négatifs ou des bandes p24 et / ou gp160 très faibles en Western-Blot) : 19 d'entre eux ont été trouvés positifs.
- Un total de 90 panels commerciaux de séroconversions bien documentées ont aussi été analysés. les résultats sur 85 de ces panels ont pu être comparés à un test marqué CE : le GENSCREEN® PLUS HIV Ag-Ab :

Résultats obtenus avec GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab comparativement au GENSCREEN® PLUS HIV Ag-Ab	Détections plus précoces (au moins un échantillon supplémentaire détecté)	Détections équivalentes (les mêmes échantillons sont reconnus positifs)	Détection plus tardive
Nombre de séroconversions	44	41	0

3) Echantillons contenant des Ag VIH

Sensibilité analytique : la limite de sensibilité du test calculée par extrapolation de la courbe obtenue en testant les dilutions de l'étalon Ag VIH de l'AFSSAPS (avec une concentration initiale de 100 pg/ml) a été trouvée inférieure à 25 pg/ml

Durant les évaluations externes, la limite de détection calculée par régression de la courbe standard du panel "Ag VIH SFTS 1998" a été établie à 13,6 pg/ml

La limite de sensibilité a aussi été évaluée sur le pannel BBI 801, pour lequel la concentration en Ag p24 a été déterminée avec le standard Dupont : la limite de détection extrapolée a été établie à 4.2 pg/ml d'Ag p24 avec ce pannel.

Sensibilité sur des échantillons Ag VIH positifs : 56 échantillons ont été testés: 53 contenant au moins 25 pg/ml d'antigène VIH étaient positifs alors que 3 échantillons contenant respectivement 13, 16 et 19 pg/ml d'Antigène VIH avaient des ratios (densité optique / valeur seuil) compris entre 0.9 et 1.00

Sensibilité sur des échantillons provenant de surnageants de cultures cellulaires : 83 surnageants de génotypes suivants ont été testés : 76 VIH1 du groupe M (16 A, 16 B, 11 C, 7D, 13 E, 4 F, 4 G, 3 H, 2 J), 4 VIH1 du groupe O, 1 VIH1 du groupe N et 2 VIH 2. Tous les échantillons VIH1 étaient réactifs à l'exception d'un échantillon de groupe O qui ne contenait que 29 pg/ml d'antigène VIH et qui avait été trouvé avec un ratio (densité optique / valeur seuil) de 0.6

Répétabilité et Reproductibilité du test

La répétabilité (intra–essai) et la reproductibilité (inter-essai) du test GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab ont été déterminées par l'analyse de 10 échantillons : 1 négatif, 3 positifs VIH1, 3 positifs VIH2 et 3 positifs en antigène VIH.

La répétabilité a été évaluée en testant ces 10 échantillons 30 fois dans le même essai tandis que la reproductibilité a été analysée en testant en double ces 10 échantillons durant 20 jours dans deux essais indépendants chaque jour. Les résultats figurent dans les tableaux ci-après :

Tableau 1 : Répétabilité (intra-essai)

Echantillons		Ratio moyen	Écart type	CV%
Négatif		0,28	0,02	5,37
VIH 1	Faiblement positif	1,62	0,07	4,32
	Moyennement positif	2,98	0,13	4,33
	Fortement positif	5,37	0,18	3,32
VIH 2	Faiblement positif	2,5	0,18	7,20
	Moyennement positif	5,35	0,45	8,48
	Fortement positif	11,19	0,58	5,21
Ag VIH	Faiblement positif	1,58	0,06	3,64
	Moyennement positif	4,19	0,17	4,13
	Fortement positif	9,21	0,34	3,65

Tableau 2 : Reproductibilité (inter-essai)

Echantillons		Ratio moyen	Écart type	CV%
Négatif		0,28	0,04	15,84
VIH 1	Faiblement positif	1,05	0,10	9,44
	Moyennement positif	2,7	0,22	8,10
	Fortement positif	4,96	0,41	8,37
VIH 2	Faiblement positif	1,91	0,41	21,15
	Moyennement positif	4,45	0,64	14,29
	Fortement positif	10,93	0,62	5,81
Ag VIH	Faiblement positif	1,29	0,08	6,48
	Moyennement positif	3,48	0,17	4,99
	Fortement positif	8,91	1,11	12,48

16. LIMITES DU TEST

De faibles taux d'antigène ou d'anticorps peuvent ne pas être détectés lors d'infection récente, en conséquence un résultat négatif signifie que l'échantillon contrôlé ne contient pas d'antigène VIH ou d'anticorps anti-VIH détectable par le test GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab. Un tel résultat n'exclut pas la possibilité d'une infection VIH1/VIH2.

La variabilité des virus VIH1 (groupe M, groupe O) et VIH 2 ne permet pas d'exclure la possibilité de réactions faussement négatives. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance que le virus VIH est absent.

Toute technique ELISA hautement sensible peut produire des réactions faussement positives.

Afin de vérifier la spécificité de la réaction, tout échantillon trouvé positif reproductible (selon les critères d'interprétation de la trousse GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab) doit être confirmé par une méthode appropriée (par utilisation d'un test spécifique de dépistage des antigènes VIH, comme le test Genetic System HIV Ag EIA puis neutralisation pour prouver la présence d'antigène VIH ou par Western-Blot pour prouver la présence d'anticorps anti-VIH).

Le chauffage des échantillons affecte la qualité des résultats.

La méthode colorimétrique de vérification du dépôt des échantillons et/ou des conjugués et/ou de la solution de révélation ne permet pas de vérifier l'exactitude des volumes distribués mais seulement de montrer la présence d'échantillons et/ou des conjugués et/ou de la solution de révélation. Le taux de réponses erronées obtenues avec cette méthode est liée à la précision du système utilisé (des CV

cumulés de pipetage et de lecture supérieurs à 10% peuvent dégrader significativement la qualité de cette vérification).

Des échantillons ictériques, hyperlipémiques ou hyperhémolysés peuvent affecter la méthode colorimétrique de vérification du dépôt du conjugué 1. Dans ce cas seule la présence des échantillons est certaine.

Dans le cas d'un lavage inefficace après l'étape d'incubation du conjugué, la vérification automatique de la distribution de la solution de révélation (par lecture à 490 nm des densités optiques des cupules) peut donner des résultats erronés avec des densités optiques supérieures à 0.100 en l'absence de solution de révélation. Cependant, ce phénomène n'a pas été observé durant les évaluations conduites sur 939 échantillons testés.

17. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARRE-SINOUSSI F., CHERMANN J.C., REY F. et al.
   Isolation of a T.lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Science 1983, 220, 868-871.
2. BRUN-VEZINET F., ROUZIOUX C., BARRE-SINOUSSI F. et al.
   Detection of IgG antibodies to lymphadenopathy-associated in patients with Aids or lymphadenopathy syndrome. Lancet 1984, june, 1253-1256
3. CLAVEL F., GUYADER M., GUETARD D. et al.
   Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2.
   Nature 1986, 324, 691-695.
4. NORRBY E., BIBERFELD G., JOHNSON PR. et al.
   The chemistry of site-directed serology for HIV infections.
   AIDS Res Human Retroviruses 1989, 5, 487-493
5. MATHIESEN T., CHIODI F., BROLIDEN P.A., et al.
   Analysis of a subclass restricted HIV1 gp 41 epitope by omission peptides.
   Immunology 1989, 67,1-7
6. PASQUALI J.L., KIENY M.P., KOLBE H. et al.
   Immunogenicity and epitope mapping of a recombinant soluble gp 160 of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein AIDS Res. Human Retroviruses 1990, 6, 1107-1113.
7. ZAAIJER H.L., EXEL-OEHLERS P.V., KRAAIJEVELD T. et al.
   Early detection of antibodies to HIV1 by third-generation assays. The Lancet 1992, 340, 770-772.
8. COUROUCE AM. and the other members of the retrovirus study group of the french society of blood transfusion. Effectiveness of assays for antibodies to HIV and p24 antigen to detect very recent HIV infections in blood donors. AIDS 1992, 6, 1548-1550
9. LANGE J.M.A., TEEUWSEN V.J.P., VAHLNE A., BARIN F. et al.
   Antigenic variation of the dominant gp41 epitope in Africa. AIDS 1993, 7, 461-466.
10. CONSTANTINE N.T.
    Serologic tests for retroviruses : approaching a decade of evolution. AIDS 1993, 7, 1-13.
11. VANDEN HAESEVELDE M., DECOURT JL., DE LEYS R. et al.
    Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent african human immunodeficiency virus isolate. J. Virology 1994, 68, 1586-1596.
12. GURTLER L.G., HAUSER P.H., EBERLE J. et al.
    A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon.
    J. Virology 1994, 1581-1585
13. NAIR B.C., FORD G., KALYANARAMAN V.S. et al.
    Enzyme immunoassay using native envelope glycoprotein (gp 160) for detection of human immunodeficiency virus type 1 antibodies. J. Clin. Microbio 1994, 32, 1449-1456.
14. GAO F., YUE L., ROBERTSON D.L. et al.
    Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2 : evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. J.Virol. 1994, 68, 7433-7447.

15. BUSCH M.P., SATTEN G.A.
Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. American J. Med. 1997, 102, 117-124.
16. AUBUCHON J.P., BIRKMEYER J.D., BUSCH M.P.
Cost-effectiveness of expanded human immunodeficiency virus-testing protocols for donated blood.
Transfusion 1997, 37, 45-51.
17. WEBER B. et al.
Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. J. Clin. Microbio. 1998, 36, 2235-2239.
18. GURTLER L., MUHLBACHER A., MICHL U. et al.
Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. J.Virology Methods 1998, 75, 27-38.
19. SIMON F., MAUCLERE P., ROQUES P. et al.
Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O.
Nature med. 1998, 4, 1032-1037.
20. COUROUCE AM. et le groupe de travail Rétrovirus de la Société Française de Transfusion Sanguine. Tests de dépistage combiné des anticorps anti-VIH et de l'antigène p24. Spectra Bio. 1999, 18, 38-44.



- CE marking (European directive 98/79/CE on *in vitro* diagnostic medical devices)
- Marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*)
- Marcodo CE (Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*)
- EG Markierung (Europäische Richtlinie 98/79/EG über *In vitro*-Diagnostika)
- Marchiatura CE (Direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro)
- Marcação CE (Directiva europeia 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*)
- CE-märkning (Europa direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter lör *in vitro*-diagnostik)
- CE-mærkningen (Europa direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik)



- For *in vitro* diagnostic use
- Pour diagnostic *in vitro*
- Para diagnóstico *in vitro*
- *In vitro*-Diagnostikum
- Per uso diagnostico *in vitro*
- Para uso em diagnóstico *in vitro*
- *In vitro* diagnostik
- *In vitro* diagnose



- Manufacturer
- Fabricant
- Fabricante
- Hersteller
- Produttore
- Fabricante
- Tillverkad av
- Fremstillet af



- Batch code
- Code du lot
- Código de lote
- Chargen-Bezeichnung
- Codice del lotto
- Código do lote
- Batch nr.
- Batchkoden



- Storage temperature limitation
- Limites de températures de stockage
- Temperatura limite
- Lagerungstemperatur
- Limiti di temperatura di conservazione
- Limites de temperatura de armazenamento
- Temperaturbegränsning
- Temperaturbegrænsning



- Catalogue number
- Référence catalogue
- Número de catálogo
- Bestellnummer
- Numero di catalogo
- Número de catálogo
- Katalognummer
- Katalognummer



- Authorised Representative
- Représentant agréé
- Representante autorizado
- Bevollmächtigter
- Distributore autorizzato
- Representante Autorizado
- Auktoriserad representant
- Autoriseret repræsentant



- Expiry date YYYY/MM/DD
- Date de péremption AAAA/MM/JJ
- Estable hasta AAAA/MM/DD
- Vervvendbar bis JJJJ/MM/TT
- Da utilizzare prima del AAAA/MM/GG
- Data de expiração AAAA/MM/DD
- Utgångsdatum År/Månad/Dag
- Anvendes før ÅÅÅÅ/MM/DD



- Consult Instruction for use
- Consulter le mode d'emploi
- Consulte la instrucción para el uso
- Siehe Gebruchsanweisung
- Consultare le istruzioni per uso
- Consulte o folheto Informativo
- Se instruktionsanvisning vid användning
- Se instruktion før brug





Bio-Rad
3, Bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tél. : 33 (0) 1 47 95 60 00
Fax.: 33 (0) 1 47 41 91 33

09/2005
code 883304